

## 浙江蝮蛇蛇毒蛋白水解酶(蛋白酶a)的 酶学性质及生物学活性研究

张东蕾\* 王起振、陈建智

(沈阳药学院生化教研室 110015)

Q959.620.6

**摘要** 应用离子交换及凝胶柱层析,从浙江蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 蛇毒中分离纯化出一种具有酪蛋白水解活性的蛋白酶a。经研究表明,以酪蛋白为底物,该蛋白酶a作用的最适pH值为9.5,最适温度为45℃,Km值为 $1.33 \times 10^{-5}$  mol/L。酶活性受EDTA抑制。蛋白酶a不水解TAME, BAEE等精氨酸酯。实验表明,蛋白酶a具有纤维蛋白溶解作用而无出血毒性,EDTA和半胱氨酸可抑制其纤溶活性。

**关键词:** 蝮蛇蛇毒, 蛋白酶a, 酶学性质, 生物学活性

蛇复虫蛇, 蛇毒, 蛋白酶a

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料

1. 蛋白酶 按前文(张东蕾,待发表)方法,将浙江蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 蛇毒进行4步柱层析分离,得到电泳纯的蛋白酶a。

2. 试剂 酪蛋白系中国医药公司北京公司产品,半胱氨酸(生化试剂)系上海康达氨基酸厂生产,对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)系中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂生产,苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)系E. Merck Darmstadt公司产品。其他试剂均为国产分析纯试剂。

#### 二、方法

1. 蛋白水解酶活力测定 参照云南省动物研究所第四室(1976)方法测定,方法如下:取蛇毒溶液(配在0.01mol/L, pH 7.5 Tris-HCl缓冲液中)1毫升,加入2%热变性的酪蛋白溶液(配在0.01mol/L, pH 7.5 Tris-HCl缓冲液中)5毫升,在37℃保温15分钟(根据蛋白水解酶活力的大小,也可延长或缩短反应时间),加入5毫升5%的三氯醋酸停止反应,放置20分钟后过滤。取滤液1毫升,加入0.5N NaOH溶液2毫升,1:3稀释的Folin试剂1毫升,于37℃放置20分钟后在660nm处进行比色,测定酪氨酸的生成量。

2. 精氨酸酯酶活力测定 参照徐淑华(1984)方法测定。

\* 现在白求恩医科大学(长春130021)基础医学院,生化教研室工作。

本文1991年9月11日收到,1992年4月23日修回。

3. 纤维蛋白溶解作用 参照刘广芬等 (1980) 方法测定。取家兔枸橼酸钠血浆 0.1 毫升, 加入  $2.5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$   $\text{CaCl}_2$  溶液 0.1 毫升, 待纤维蛋白凝块形成后, 加入 0.2 毫升样品于凝块上, 置  $37^\circ\text{C}$  保温 24 小时, 观察凝块有无溶解。若凝块溶解, 则表明样品具有纤溶酶活性。

4. 出血毒性实验 参考张洪基等 (1980) 方法测定。重约 200 克的大白鼠, 用乙醚麻醉后, 在背部选 4 个点, 每点皮内注射 0.2 毫升样品。每只大白鼠均同时注入生理盐水作阴性对照, 注入浙江蝮蛇毒粗毒溶液 (用生理盐水配制) 作阳性对照, 蛋白酶 a 溶液 (用生理盐水配制) 分别注入 2 点。24 小时后, 将大白鼠乙醚麻醉处死, 剥皮观察注射部位是否有出血斑点, 若有出血斑点, 表明试样具有出血毒性, 斑点愈大, 则毒性愈强。

## 结 果

### 一、蛋白酶 a 的酶学性质

1. 最适 pH 以酪蛋白为底物, 蛋白水解酶活力测定见方法 1, 蛋白酶 a 配在不同 pH 值的  $0.01 \text{ mol/L}$  Tris-HCl 缓冲液中, 测定蛋白酶 a 的最适 pH 值, 曲线呈钟形, 在 pH 9.5 左右, 酶反应活力最高, 见图 1。

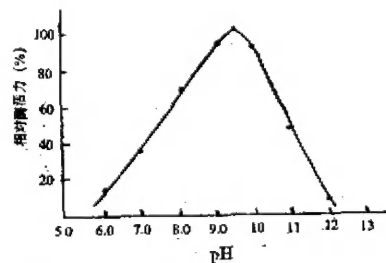


图 1 pH 对蛋白酶 a 活性的影响  
Fig. 1 Effect of pH on proteinase a activity

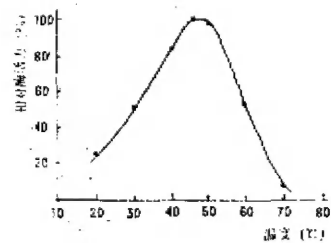


图 2 温度对蛋白酶 a 活性的影响  
Fig. 2 Effect of temperature on proteinase a activity

2. 最适温度及热稳定性 以酪蛋白为底物, 蛋白水解酶活力测定见方法 1, 蛋白酶 a 配在 pH 9.0,  $0.01 \text{ mol/L}$  Tris-HCl 缓冲液中, 测得蛋白酶 a 的温度-酶活力曲线如图 2 所示, 其最适温度在  $45^\circ\text{C}$ ,  $80^\circ\text{C}$  保温 20 分钟, 酶活性完全丧失。

3. 底物专一性 蛋白酶 a 除能水解酪蛋白外, 还具有纤维蛋白溶解作用 (见后面生物学活性实验), 但不作用于 TAME, BAEE 等精氨酸酯。

4.  $K_m$  和  $V_m$  的测定 按 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 在  $37^\circ\text{C}$  下, 酪蛋白浓度为  $0.133 - 1.33 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  (溶于  $0.05 \text{ mol/L}$ , pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液中), 加入 35 微克蛋白酶 a 测得蛋白酶 a 对酪蛋白的米氏常数  $K_m$  和最大反应速度  $V_m$  值分别为  $K_m = 1.33 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$   $V_m = 51.3$  微克分子/分钟 (见图 3)。

5. EDTA 对蛋白酶 a 活性的影响 以酪蛋白为底物, 蛋白水解酶活力测定见方法 1, 蛋白酶 a 浓度为 0.06 毫克/毫升 (内含不同浓度的 EDTA, 配在 pH 9.0,  $0.01 \text{ mol/L}$

Tris-HCl缓冲液中), 在45℃下, 反应20分钟, 测得EDTA对蛋白酶a的抑制曲线(见图4)。

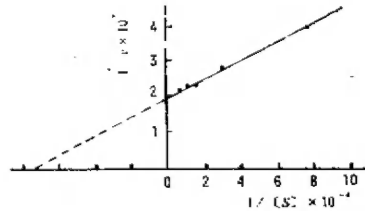


图3 蛋白酶a的反应速度对底物酪蛋白浓度的双倒数作图

Fig. 3 The double reciprocal figure of proteinase a reaction velocity to the substrate (casein) concentration

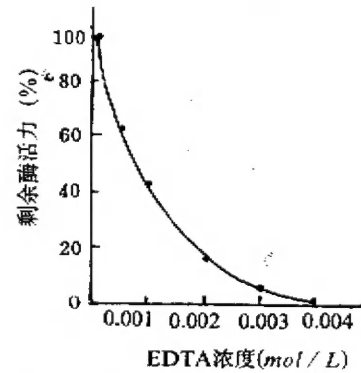


图4 EDTA对蛋白酶a活性的影响

Fig. 4 Effect of EDTA on proteinase a activity

6. 金属离子对蛋白酶a活性的影响 以酪蛋白为底物, 蛋白水解酶活力测定见方法1, 蛋白酶a浓度为1毫克/毫升(内含0.05mol/L金属离子, 配在pH7.0, 0.01mol/L Tris-HCl缓冲液中), 温度为45℃, 反应20分钟, 测得某些金属离子对蛋白酶a活性的影响见表1。由表1可知:  $Mg^{2+}$ 对酶活性有明显的激活作用,  $Ca^{2+}$ 的作用不明显, 而 $Cu^{2+}$ 和 $Zn^{2+}$ 则有明显的抑制作用。

表1 金属离子对蛋白酶a活性的影响

Tab. 1 Effect of metal ions on proteinase a activity

| 金属离子(0.05mol/L) | 无金属离子 | $MgCl_2$ | $CaCl_2$ | $CuSO_4$ | $ZnSO_4$ |
|-----------------|-------|----------|----------|----------|----------|
| 相对酶活力(%)        | 100   | 125      | 96       | 74       | 62       |

## 二、蛋白酶a的生物学活性

1. 纤维蛋白溶解作用 以生理盐水做阴性对照, 2毫克/毫升的浙江蝮蛇毒溶液(用生理盐水配制)做阳性对照, 蛋白酶a的浓度为0.3毫克/毫升(用生理盐水配制), 纤维蛋白溶解实验见方法3, 每组样品同时做4份, 结果测得蛋白酶a具有纤维蛋白溶解作用, 即具有纤溶酶活性。

当蛋白酶a浓度为0.3毫克/毫升时,  $2.0 \times 10^{-2}$ mol/L EDTA及 $5.0 \times 10^{-2}$ mol/L 半胱氨酸均可完全抑制其纤溶活性。

2. 出血毒性 取6只大白鼠, 体重在200—230克之间, 雌雄各半, 按文献(张洪基, 1980)的给药剂量,



图5 蛋白酶a出血毒性实验结果

Fig. 5 The picture of hemorrhagic activity experiment of proteinase a

注射部位: ①生理盐水 ②粗毒 ③④蛋白酶a

粗毒及蛋白酶 a 的给药剂量均为  $0.63\mu\text{g/g}$ , 结果测得注射粗毒部位有一个平均直径为 10 毫米左右的出血斑点, 而注射蛋白酶 a 的部位无任何出血斑点 (见图 5)。将给药剂量增大到  $1.0\mu\text{g/g}$ , 注射蛋白酶 a 的部位也不见任何出血斑点, 故可认为蛋白酶 a 不具有出血毒性。

## 讨 论

作者应用 DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-75、Sephadex G-200 和 QAE-Sephadex A-25 4 步柱层析从浙江产蝮蛇蛇毒中分离纯化出一种具有酯蛋白水解活性的蛋白水解酶, 称之为蛋白酶 a。通过对蛋白酶 a 的性质研究得知, 蛋白酶 a 是一分子量为 68000, 等电点为 6.4 的偏酸性糖蛋白。其紫外吸收光谱表明, 在 277nm 波长处有最大吸收,  $E_{277}^{1\%1\text{cm}} = 0.681$ 。以酯蛋白为底物, 其作用最适 pH 值在 9.5, 最适温度为  $45^\circ\text{C}$ , 对热较稳定,  $80^\circ\text{C}$  保温 20 分钟酶活性完全丧失。  $K_m = 1.33 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ , EDTA 可抑制其蛋白水解酶活性及纤溶酶活性, 这表明它是一个金属蛋白酶。此外,  $\text{Mg}^{2+}$  对蛋白酶 a 有激活作用, 而  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对其均有不同程度的抑制作用。氨基酸组成分析表明蛋白酶 a 含有较多的天冬氨酸、谷氨酸和赖氨酸。蛋白酶 a 具有纤溶酶活性, 但无出血毒性。

蛋白酶 a 的理化性质、酶学性质同其它种类蝮蛇毒中的蛋白水解酶的性质很相似。其分子量、等电点、作用的最适 pH 值, 热稳定性及氨基酸组成等与日本蝮蛇毒中的蛋白酶 a 非常接近 (Oshima 等, 1968)。

由于蛋白酶 a 还具有纤维蛋白溶解作用, 所以从另一个角度也可以说, 我们从浙江产蝮蛇毒中分离纯化出一种纤维蛋白溶酶 (即蛋白酶 a) 纯化出的这种纤溶酶同台湾尖吻蝮蛇毒中的纤溶酶 (Ouyang 等, 1976) 相比, 其分子量和等电点不同, 但分子中都含有丰富的天冬氨酸及谷氨酸, 作用的最适 pH 值都大于 7, 都能水解酯蛋白, 而不水解 TAME 等精氨酸酯。此外, 其纤溶活性及酯蛋白水解活性均受 EDTA 抑制, 但纯化出的这种纤溶酶无出血毒性。

## 参 考 文 献

- 云南动物研究所第四室. 1976. 我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力测定. 生物化学与生物物理学报, 8(2):151.  
 刘广芳等. 1980. 福建产尖吻蝮蛇 (*Aghistrodon acutus*) 蛇毒的柱层析分离及活力和某些生理效应的测定. 动物学研究, 1(1):107.  
 张洪基等. 1980. 尖吻蝮 (*Aghistrodon acutus*) 蛇毒的分离及其生物活性的研究. 动物学研究, 1(2):157.  
 徐淑华, 任永忠. 1984. 江西蝮蛇毒纤溶酶的纯化和性质的研究. 中国医科大学学报, 13(6):34.  
 Oshima, G. et al. 1968. Studies on snake venoms purification and some physicochemical properties of proteinase a and c from the venom of *Aghistrodon halys blomhoffii*. J. Biochem (Tokyo), 64(2): 227.  
 Ouyang, C. et al. 1976. Purification and characterization of the fibrinolytic principle of *Aghistrodon acutus* venom. Biochim, Biophys. Acta, 459(1):146.

## ENZYMATIC PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A PROTEOLYTIC ENZYME (PROTEINASE A) FROM THE VENOM OF *Agkistrodon Halys* PALLAS

Zhang Donglei Wang Qizheng Cheng Jianzhi

(The department of biochemistry in Shenyang college of pharmacy 110015)

A proteolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas has been purified by ion-exchange chromatography and by gel-filtration. This proteolytic enzyme (called proteinase a) can hydrolyze casein. Using casein as the substrate, the optimum pH is about 9.5, the optimum temperature is about 45°C, and  $K_m = 1.33 \times 10^{-5}$  mol/L. Its activity toward casein was inhibited by EDTA. It did not act on TAME and BAEE. Proteinase a showed fibrinolytic activity in vitro, EDTA and cysteine could inhibit this activity.

**Key words:** *Agkistrodon halys* Pallas, Proteinase a, Enzymatic properties, Biological activities

### 欢迎订阅《特产研究》

《特产研究》是中国农林科学院特产研究所和中国农学会特产学会联合主办的中央级特产科技期刊。主要报道珍贵稀有的野生经济动植物资源变为家养家植的开发利用、引种驯化、遗传育种、饲养繁殖、栽培管理、病虫害防治、产品加工、贮藏保鲜等方面的最新科研成果、生产经验、市场动态等。本刊结合国情, 实用性强, 内容丰富, 报道及时, 适合各级从事特产科技工作的有关院校师生、科研人员、生产技术人员及广大城乡特产专业爱好者和领导者阅读。

本刊为季刊, 16开本64页, 季末月出版, 每期定价1.50元, 全年6.00元。

本刊自办发行, 全年随时均可订阅, 通过邮局汇款至吉林市左家特区, 中国农业科学院特产研究所《特产研究》编辑部, 收款人王守本。

本刊尚存部分过刊(1985—1992年), 欢迎选购。

《特产研究》编辑部